TOYOPEARL®

金属キレートアフィニティークロマト用担体

TOYOPEARL AF-Chelate-650M

取扱説明書

東ソー株式会社
TOSOH

ご使用の前に

¡本製品を使用する前に，必ずこの取扱説明書をよく読んで理解してください．
¡この取扱説明書は，手近な所に大切に保管し，必要なときにいつでも取り出せるようにしてください．
¡製品本来の使用方法および取扱説明書で指定した使用方法を守ってください．
¡本書の安全に関する指示に対しては，指示内容を理解の上，必ず従ってください．
以上の指示を必ず厳守してください．
指示に従わないと，けがや事故の恐れがあります．

【取扱説明書について】

¡取扱説明書の内容は，製品の性能・機能の向上により将来予告なしに変更することがあります．
¡取扱説明書の全部または一部を無断で転載，複製することは禁止しています．
¡取扱説明書を紛失したときは，弊社営業担当者までお問い合わせください．
¡取扱説明書の内容に関しては万全を期していますが，万一不審な点や誤り，記載漏れに気づいたときは，お手数ですが巻末の連絡先までご連絡ください．

安全上のご注意

- ご使用の前に，この「安全上のご注意」をよくお読みのうえ，正しくお使いください．
- この項目は，いずれも安全に関する内容ですので，必ず守ってください．
- 「警告」「注意」の意味は次のようになっています．

⚠ 警告	取扱いを誤った場合，使用者が死亡または重傷を負う可能性が想定されるもの．
⚠ 注意	取扱いを誤った場合，使用者が傷害を負う可能性が想定されるものまたは物的損害の発生が想定されるもの．

ご使用時

⚠ 警告
火気厳禁 引火性のある溶媒を使用する場合，火気の使用は厳禁です．火災，爆発の原因になります．

⚠ 注意
換気に注意を 引火性，毒性のある溶媒を使用する場合，十分換気をしないと火災，爆発，中毒の原因になります．
液漏れに注意を 溶媒等の液漏れは，感電，中毒，薬傷，火災，腐食などの原因になります．液漏れの場合は，適切な保護具を付けた上で，液を取り除いてください．

⚠ 注意

¡保護具の着用を

¡有機溶媒や酸などの溶離液を取扱う場合は，保護メガネ，手袋などの保護具をご使用ください．薬傷を負う恐れがあります．

¡容器の取扱いに注意を

¡保存温度および取扱いが不適切であると，容器が破裂，破損する可能性があります．取扱いには十分注意してください．

¡適切な使用方法を

¡本バルクゲルは分離，精製等に用いるもので，それ以外の目的には使用しないでください．

¡圧力に注意を

¡送液ポンプ等により，本バルクゲルをカラムに充てんまたは充てんし測定する場合，過度な圧力は十分な性能が得られない場合やカラムの破裂，ゲルの飛散等の可能性があります．本バルクゲルの取扱説明書に記載された規定以上の圧力にならぬように注意ください．適切な保護具を付けた上で，十分注意して作業をおこなってください．

¡分離精製物の取扱いに注意を

¡得られた分離精製物または精製溶液を製品及び中間体として使用する場合は，十分にその安全性の確認をおこなってご使用ください．

¡処分には適切な処理を

¡廃棄する場合は，産業廃棄物として適切な処理をおこなってください．

¡購入時の容器が不要になった場合は，溶媒が残らないように処置・洗浄をし，種類別に適切な処分をおこなってください．

【その他の注意】

¡ 本書は保存してください．また，ご利用者が代わる場合には次のご利用者にお渡しください．

目　次

1．はじめに…… 1
2．原理…… 1
3．カラムへの充てん…… 1
3-1 微粒子の除去
3-2 スラリーの調整，カラム充てん
4．使用順序…… 2
5．標準的使用法…… 2
5-1 金属の選択
5-2 溶離液およびpHの選択
5-3 溶出
5-4 再生
5-5 酸，アルカリ安定性
6．保存…… 3

1．はじめに

TOYOPEARL AF-Chelate-650Mは，ゲルろ過剤TOYOPEARL HW-65にイミノジ酢酸を導入したMCAC（Metal chelate affinity chromatography）用の充てん剤です．

2．原理

MCACは，Porathらによって紹介されて以来，多くのタンパク質に応用され，今日ではタンパク質分離精製手段として用いられています．重金属はアミノ酸の中で特にヒスチジン，システイン，トリプトファンと結合するため，これらのアミノ酸残基を表面に露出させているタンパク質は，選択的に吸着されます．結合の強さは主に重金属の種類，溶離液のpHに左右されます．

3．カラムへの充てん

3-1　微粒子の除去

ゲルには若干の微粒子が含まれています．特に多量のゲルをご使用になる場合，目づまりの原因になることも考えられます．ゲルはデカンテーション（1～2分撹拌して，30分静置後，上澄みを捨てる）を3回程度繰返すことにより微粒子を除去して，ご使用ください．

3-2　スラリーの調製，カラム充てん

デカンテーションで微粒子を除去したゲルを，充てん溶媒で洗浄します．洗浄後スラリー濃度が30～50％になるように充てん溶媒を加えてスラリー化しカラムに充てんします．

充てんは他のトヨパールと同じように加圧（50～数100KPa）下でおこないます．この場合はポンプ（HPLC用ポンプ，ペリスタリックポンプ）とリザーバーが必要です．簡易法である自然落差充てん法は，従来からアフィニティークロマトでよく使用されていますが，水圧を大きく取っていただく方が性能の良いカラムが得られます．

4. 使用順序

先ず金属イオンを，TOYOPEARL AF-Chelate-650Mに結合させることから出発します．

1．ゲルの調整
●約40 μmol程度の金属イオンを含む溶液で，結合させる．
●結合は，カラム法でもビーカー中でもよい．

d

2．カラムの平衡化およびアプライ
カラムを平衡化し，試料をアプライする．非吸着成分を平衡化液で洗い流す．

d

3．溶出
pHグラジエントにより，溶出分離させる．溶出液には，0.5～1.0mol/LのNaClを加える．

d

4．再生
約0.05mol/LのEDTA液を流す．

5. 標準的使用法

5-1 金属の選択

一般に利用される金属はCu^{2+}とZn^{2+}です．Cu^{2+}は，結合力が非常に強いため試料によってはCu^{2+}にしか結合しないものもあります．Zn^{2+}は，Cu^{2+}に比べ結合力は弱く，試料を選択的に溶出させるのに有効です．その他Ni^{2+}，Co^{2+}等の金属も使用可能です．

5-2 溶離液およびpHの選択

金属を添加した後，初期緩衝液で平衡化します．金属とタンパク質の結合はpH7～9付近で起こるため，緩衝液は，りん酸トリス等が有効です．なお，トリスは置

換アミノ基を含むため，結合を阻害する場合もまれにあります．EDTAや，キレート特性のあるクエン酸のような試薬は含まないようにしてください．

また，イオン交換作用を抑制するため緩衝液に0.5～1.0mol/L NaClを加えてください．

5-3 溶出

結合はpH依存性ですから標準的な溶出法としては，pHを変化させる方法となります．

a **pH勾配**

金属とタンパク質の結合は，pHが下がると弱まるため，pH7からpH3へのpH勾配で溶出可能です．

s **拮抗剤**

グリシン，ヒスチジン，イミダゾールまたは塩化アンモニウムの濃度を高めることによって溶出可能です．

d **キレート剤**

EDTAやEGTAのようなキレート剤で溶出する．キレート剤は，ゲルから金属をはぎとるため吸着したタンパク質どうしの分離はできません．

5-4 再生

カラムを再生するには，50mmol/L EDTA溶液で金属を取り除き，その後新しく金属イオンを添加してください．

5-5 酸，アルカリ安定性

0.5mol/L NaOH，0.5mol/L HClに安定です．

6. 保存

ゲルは20％エタノール水溶液で室温（4℃～35℃）で保存してください．

以下の名称は東ソー株式会社の登録商標です.
HLC, TSK-GEL, TSKgel, TSKgel SuperMultipore,
BioAssist, Enantio, PStQuick,
エンバイロパック/Enviropak, トヨパール/TOYOPEARL, ToyoScreen,
TOYOPEARL GigaCap, トヨパールメガキャップ/TOYOPEARL MegaCap,
トヨパールパック/TOYOPEARLPAK, TOYOPAK

東ソー株式会社　バイオサイエンス事業部

東京本社　営業部　☎(03)5427-5180　〒105-8623　東京都港区芝3-8-2
大阪支店　バイオサイエンスG　☎(06)6209-1948　〒541-0043　大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店　バイオサイエンスG　☎(052)211-5730　〒460-0003　名古屋市中区錦1-17-13
カスタマーサポートセンター　☎(0120)17-1200　〒252-1123　神奈川県綾瀬市早川2743-1

Printed in Japan